



EFEITO DO ÔMEGA-3 SOBRE ATIVIDADE ELÉTRICA CEREBRAL DE RATOS WISTAR ADULTOS EXPOSTOS À RADIAÇÃO IONIZANTE

Hanna Gracie Inez de Freitas Lima^{1*}, Eva Luana Almeida da Silva¹, Leandro Álvaro de Alcantara Aguiar¹, Mirella Claudino Oliveira Silva¹, Raldney Ricardo Costa da Silva¹, Isvânia Serafim da Silva Lopes², Jeine Emanuele Santos da Silva¹, Romildo Albuquerque Nogueira¹

¹Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional, UFRPE; ²Laboratório de Biofísica Celular e Molecular, UFPE
*hanna_gracie@hotmail.com

INTRODUÇÃO

As radiações têm grande aplicação na medicina moderna e na indústria, quer seja com fins diagnósticos ou terapêuticos. Entretanto, os efeitos colaterais ocasionados pela exposição dos indivíduos à radiação são sua principal limitação de uso (ELTAHAWY et al., 2015).

A radioterapia é uma modalidade terapêutica muito utilizada para tratamento de tumores na região da cabeça e pescoço. Baseia-se na utilização do efeito da radiação ionizante para causar a morte das células neoplásicas, evitar sua multiplicação (CUNHA et al., 2014). Os mecanismos de ação da radiação se dão de forma direta, quando a radiação interage diretamente com as moléculas importantes como as de DNA e/ou indireta, quando a radiação quebra a molécula da água, formando assim radicais livres que podem atacar outras moléculas importantes (OKUNO, 2013).

O cérebro é o órgão mais importante do sistema nervoso central (SNC). É rico em lipídios das mais diferentes classes, como esteróides e fosfolípidos, que por sua vez estão diretamente associados à estrutura e função deste órgão. Assim, modificações nos níveis lipídicos das dietas podem interferir na dinâmica cerebral, causando alterações na excitabilidade dos tecidos e, consequentemente, na atividade elétrica do cérebro (NOGUEIRA et al., 2019). As células nervosas são sensíveis aos danos induzidos por radicais livres, devido ao alto uso de oxigênio, a alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) e a menor concentração de moléculas antioxidantes em comparação com outros tecidos (MANSOUR et al., 2017).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) são biomoléculas de cadeia longa com múltiplas ligações de carbono duplo, considerados essenciais por não serem sintetizados em quantidades suficientes no corpo humano por causa da falta de enzimas delta-12 e delta-15 dessaturase, que removem átomos de hidrogênio e criam ligações duplas, necessárias para criar ácidos graxos poliinsaturados (DE GIORGIO; TAHA, 2016). Diante disso, esses AGPIs devem ser obtidos por meio da dieta, e uma vez adquiridos, podem originar uma série de outros ácidos graxos endogenamente por meio de processos enzimáticos de alongamento e dessaturação (TEJADA, 2019).

Os AGPIs também desempenham papel fundamental para o bom funcionamento do organismo, participam em muitos processos fisiológicos no cérebro, sendo cruciais para crescimento e desenvolvimento neuronal e ainda, desempenham um papel importante como moduladores críticos da função cerebral e mecanismos de estresse oxidativo (MCNAMARA, VANNEST; VALENTINE, 2015).

Os AGPIs ômega-3 (W-3) são considerados ácidos graxos essenciais e fornecem dois neuro-ativos: O ácido docosahexaenóico (DHA), abundantemente presente no cérebro dos mamíferos, compreendendo até 40% dos ácidos graxos totais do cérebro e o ácido eicosapentaenóico (EPA), que em contraste com o DHA, representa menos de 1% da quantidade total de ácidos graxos no cérebro (MCNAMARA; CARLSON, 2006). Ambos estão envolvidos no crescimento e função do tecido nervoso (TANG et al., 2016).

Estudos indicam que o acúmulo de DHA é crucial para o neurodesenvolvimento, exibindo também efeitos neuroprotetores (MCNAMARA; VANNEST; VALENTINE, 2015) e neurotróficos (SABLE; KALE; JOSHI, 2013), sendo importante para a manutenção das propriedades físico-químicas da membrana neuronal, aumentando a fluidez desta e facilitando o transporte transmembrana, o que pode favorecer o desencadeamento de potenciais de ação e consequentemente aumento na excitabilidade cerebral, além de apresentar importante efeito anti-inflamatório no sistema nervoso (BRENNAN e CARLSON, 2014).

Estudos indicam que níveis reduzidos de ômega-3 no cérebro são acompanhados por déficit de aprendizagem e alterações de humor relacionadas às deficiências nos processos de neurotransmissão (HARBEBY et al., 2012). Outros trabalhos, como aqueles realizados por Pessoa et al. (2017) e Nogueira et al. (2019) mostraram que a modificação do componente lipídico na dieta interferiu na atividade elétrica cortical de ratos em condições normais ou patológicas. Assim, alterações nos níveis lipídicos dietéticos podem alterar a fluidez das membranas neuronais e modular a geração e propagação de impulsos nervosos, modificando consequentemente a atividade elétrica cerebral.

Os processos neurais são gerados pela propagação da atividade elétrica no cérebro. Esta atividade produz potenciais elétricos que podem ser medidos através de eletrodos e gerados a partir da corrente extracelular pelos potenciais pós-sinápticos nos dendritos apicais de neurônios piramidais dentro do cérebro (RINCON, SHIMODA, 2016). Dessa forma a atividade elétrica registrada eletrocorticograma (ECoG) corresponde ao registro dos potenciais de membrana resultantes das sinapses, em especial o potencial pós-sináptico, e permite avaliar se a atividade elétrica cerebral está dentro do padrão de normalidade ou se existem disfunções (PESSOA et al., 2017).

Tendo em vista que o estresse oxidativo resulta em quadros agudos e crônicos, se faz necessário a proteção neural contra os danos produzidos pela radiação ionizante (RI) e radicais livres. Então o presente estudo teve como objetivo investigar a influência do ômega-3 na atividade elétrica cerebral em ratos expostos à radiação ionizante, como um possível agente neuroprotetor.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, Dois Irmãos, Recife - PE. Foram utilizados *Rattus norvegicus*, variedade *Albinus*, linhagem Wistar, machos, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, local onde foram realizados os ensaios biológicos com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais sob licença n. 97/2018. Os mesmos foram mantidos e manipulados em ambiente com temperatura e umidade controladas, em ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e alimentação *ad libitum*.

Na oitava semana pós-natal, os animais foram divididos em 2 grupos experimentais, de acordo com o tratamento ao qual foram submetidos:

Grupo Tratado: Óleo de peixe (1ml/ VO/ dia/100g PV) e exposição à radiação ionizante (n = 8).

Grupo Controle: Solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) e exposição à radiação ionizante (n = 8).

A gavagem foi realizada para administrar tanto o NaCl 0,9% quanto o óleo de peixe (cápsulas contendo EPA 180 mg e DHA 120 mg) nos grupos experimentais. Essa etapa experimental foi realizada num período de 8 semanas consecutivas.

Na 17ª semana pós-natal, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implante de eletrodos, sobre o hemisfério cerebral direito, sendo um deles inserido na região parietal do córtex sensori-motor e um segundo na região anterior ao bregma, conforme descrito por Pessoa et al. (2017).

No 15º dia pós-operatório (19ª semana) os animais foram expostos à radiação ionizante. A irradiação foi realizada nos animais anestesiados com associação de xilazina (10mg/kg) e cetamina (75mg/kg) aplicadas por via intraperitoneal. Os animais anestesiados foram expostos à radiação no Instituto de Radioterapia Waldemir Miranda (IRWAN). Foram aplicados 9 Gy de radiação gama de ^{60}Co na parte superior da cabeça e em seguida mais 9 Gy na parte inferior da cabeça, totalizando 18 Gy. A fonte de aplicação da RI é a mesma utilizada nos processos de radioterapia, com meia-vida física de 5,3 anos e radiações gama em cascata de 1,17 e 1,33 MeV. A distância focal foi de 80 cm da fonte de irradiação. A taxa de dose da fonte foi de 123,4 cGy por minuto e o tempo de exposição de 15,27 minutos.



Figura 1. Acelerador linear Varian, modelo Clinac 600C (A), com os animais anestesiados e posicionados em decúbito dorso-ventral para irradiação da região de cabeça e pescoço (B). (Fonte: arquivo pessoal).

O ECoG dos animais foi realizado durante exploração espacial em dois momentos: M1: 24 horas pré-exposição à RI e M2: 24 horas pós-exposição, durante 30 minutos, com os animais alocados em uma caixa plástica aberta mantida em uma gaiola de Faraday.

Os sinais do ECoG foram amplificados e registrados, utilizando o aparelho EMG 410C (EMG System, Brasil) numa taxa de amostragem de 6000 pontos por segundo.

A análise de cada registro foi realizada em um segmento de 5 minutos, totalizando um montante de 255000 pontos. Na sequência, os dados foram importados para o programa Matlab 7.8 (2009) e analisados por meio da aplicação da Transformada de Fourier (equação 1), a partir da qual obtivemos o espectro de potência das ondas cerebrais do ECoG (MACIVER; BLAND, 2014; VARGHESE et al., 2014).

$$F(f) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-i2\pi ft} dt \quad (1)$$

$$\overline{E} = \frac{\int_{f_1}^{f_2} |F(f)|^2 df}{\int_{f_1}^{f_2} df} \quad (2)$$

Para a análise estatística utilizou-se o software Graphpad Prism® 5.01. Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Os dados cujos valores seguiram uma distribuição gaussiana foram verificados pelo teste t de Student para amostras independentes nas análises entre os grupos experimentais. Para avaliação intragrupo (pré e pós-exposição a RI) aplicou-se o teste t de Student para amostras dependentes. Aqueles com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Mann-Whitney (independentes) ou Wilcoxon (dependentes). Todas as análises foram realizadas ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o espectro de potência do registro ECoG foi possível identificar as variações entre as contribuições dos ritmos cerebrais de diferentes frequências dos animais dos grupos Controle e Tratado antes e após a exposição à RI da região de cabeça e pescoço com doses de 18 Gy. A técnica de transformada de Fourier, pela qual obtemos o espectro de potência (MACIVER; BLAND, 2014), trata-se de um método de análise linear, que permite passar a informação do domínio do tempo para o domínio da frequência, possibilitando conhecer a contribuição de cada componente de frequência presente numa série temporal (WEISSTEIN, 2004).

No presente trabalho, observou-se uma maior contribuição dos ritmos delta nos grupos experimentais, antes e após a exposição à radiação ionizante (Tab.1). Esses ritmos são caracterizados por frequências que variam de 0,5 a 4 Hz (para a onda delta) e 4 a 8 Hz (para a onda teta), estando associados a estágio de sonolência, sono leve ou estados emocionais alterados, sendo frequentemente observados em animais de experimentação com hábito noturno quando avaliados durante períodos diurnos. Na sequência, observa-se contribuição do ritmo alfa (8 - 12 Hz) e, em menor expressão, o ritmo beta (12 - 30 Hz), sendo este último observado em atividade física ou mental específica e estados de tensão, além de estar relacionada ao processo de cognição (BUZAKI, 2006).

Para a atividade cerebral dos animais avaliada em M1 (24 horas antes da irradiação) foi observado que no espectro de potência obtido para os animais do grupo Tratado houve um aumento da contribuição da onda delta (p = 0,0138) e diminuição da onda beta (p = 0,0050) em relação ao grupo Controle. Para as ondas alfa e teta não houve modificação do padrão dos ECoGs analisados (p < 0,05).

Tabela 1. Valores médios de potência (em $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) de diferentes ritmos cerebrais em ratos de controle e ratos suplementados com ômega-3.

	CONTROLE		TRATADO	
	PRE	POS	PRE	POS
DELTA	113,4 ± 15,5 *	104,3 ± 15,73	137,6 ± 19,43 *	120,9 ± 21,73
TETA	50,56 ± 5,113	55,83 ± 15,82	54,88 ± 11,67	65,7 ± 20,59
ALFA	28,38 ± 6,494	25,59 ± 5,545	24,76 ± 4,628	24,11 ± 3,949
BETA	10,51 ± 4,504 *	11,87 ± 6,917	1,911 ± 3,692*	5,79 ± 5,812

* - diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos para o respectivo ritmo cerebral.

Os resultados obtidos diferem de estudo realizado por Pessoa et al. (2017), no qual se verificou o efeito da suplementação hiperlipídica ou com ômega-3 sobre a atividade elétrica cortical. Os dados obtidos pelos referidos autores mostraram que os animais que foram suplementados com ômega-3 tiveram aumento na onda beta, enquanto na onda delta energia foi reduzida.

Os efeitos biológicos decorrentes do consumo de ômega-3 são frequentemente atribuídos à inibição competitiva da produção de eicosanóides. O acúmulo dos AGPIs na membrana celular pode atuar em vários níveis, incluindo na fluidez da membrana, na ligação ao receptor, transdução de sinal e atividade enzimática (BENAIS-PONT et al., 2006).

Em estudo realizado por Forville (2008) observou-se que a suplementação com ômega-3 foi capaz de provocar alterações na composição lipídica encefálica. De acordo com o autor a modificação do *status* lipídico do tecido cerebral tem influência positiva em quadros neuropatológicos, havendo assim a necessidade de incorporação dos AGPIs n-3 para a funcionalidade adequada do SNC.

Nas avaliações referentes aos efeitos agudos da exposição a RI realizadas nos animais 24 horas após irradiação (M2) não foram encontradas alterações significativas nos espectros de potência dos ECoGs dos animais, tanto para aqueles do grupo Tratado quanto do grupo Controle. Também não foram encontradas alterações significativas quando se comparou os dados dependentes (intra-grupo).

Estes resultados discordam com aqueles observados por Aguiar (2015), em que por meio do espectro de potência do ECoG foi possível identificar que os ritmos teta e alfa de animais irradiados aumentaram em relação aos dados analisados 24 horas antes da exposição à radiação ionizante na região da cabeça e pescoço e doses da ordem de 18 Gy.

Embora a análise dos efeitos da RI sobre a atividade cortical em ratos sejam escassos na literatura, há um quantitativo razoável de trabalhos relatando as modificações que ocorrem no cérebro de roedores irradiados, em que são observadas alterações morfológicas, metabólicas e funcionais do tecido nervoso em condições de exposições em doses únicas e fracionadas, ratificando a sensibilidade do sistema nervoso à radiação ionizante de diferentes fontes radioativas (JIANG et al., 2015; BOLCAEN et al., 2017; YANG, 2017).

CONCLUSÕES

Por meio dos espectros de potência obtidos a partir dos ECoGs dos animais expostos à radiação ionizante foi possível observar alterações significativas nas ondas delta e beta dos animais do grupo suplementado com ômega-3 em relação ao controle somente quando avaliados 24 horas antes da irradiação. Para as análises realizadas 24 horas após a exposição não foram observadas alterações significativas entre os referidos grupos para nenhuma das ondas cerebrais.

REFERENCIAS

- AGUIAR, L.A. A. **Correlação de longo alcance no eletrocorticograma como um bioindicador de exposição cerebral à radiação ionizante**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- BENAIS-PONT, G. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and ionizing radiation: combined cytotoxicity on human colorectal adenocarcinoma cells. *Nutrition, Burbank, Los Angeles County, Califórnia*, v. 22, n. 9, p. 931, 2006.
- BRENNAN, J T; CARLSON, S E. Docosahexaenoic acid and human brain development: evidence that a dietary supply is needed for optimal development. *Journal of human evolution, Cornell University, Ithaca, NY*, v. 77, p. 99-106, 2014.
- BUZSAKI, G. *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press, 2006.
- CUNHA, S C S et al. A utilização da radioterapia no tratamento do carcinoma de células escamosas cutâneo felino avançado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte*, v. 66, n. 1, p. 7-14, 2014.
- DEGIORGIO, Christopher M.; TAHA, Ameer Y. Omega-3 fatty acids (ω -3 fatty acids) in epilepsy: animal models and human clinical trials. *Expert review of neurotherapeutics*, v. 16, n. 10, p. 1141-1145, 2016.
- ELTAHAWY, N A et al. Role of Omega-3 Fish Oil on Electrophysiological Variations in Rats Exposed to Sodium Fluoride and/or Gamma Rays. *Journal of Nuclear Technology in Applied Science, online*, v. 3, n. 4, p. 221-228, 2015.
- FORVILLE, J J S. **Efeito da suplementação com óleo de peixe em diferentes momentos da maturação do sistema nervoso**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- HARBEBY, E et al. n-3 PUFA status affects expression of genes involved in neuroenergetics differently in the fronto-parietal cortex compared to the CA1 area of the hippocampus: effect of rest and neuronal activation in the rat. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 86, n. 6, p. 211-220, 2012.
- JIANG, X. et al. A gamma-knife-enabled mouse model of cerebral single-hemisphere delayed radiation necrosis. *PLoS one*, v. 10, n. 10, p. e0139596, 2015.
- LOGANOVSKY, K N.; YURYEV, K L. EEG patterns in persons exposed to ionizing radiation as a result of the Chernobyl accident: part 1: conventional EEG analysis. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, v. 13, n. 4, p. 441-458, 2001.
- LOGANOVSKY, K N.; YURYEV, K L. EEG patterns in persons exposed to ionizing radiation as a result of the Chernobyl accident. Part 2: quantitative EEG analysis in patients who had acute radiation sickness. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, v. 16, n. 1, p. 70-82, 2004.
- MACIVER, B; BLAND, B H. Chaos analysis of EEG during isoflurane-induced loss of righting in rats. *Frontiers in systems neuroscience, Canadá, EUA*, v. 8, p. 203, 2014.
- MANSOUR, H; SAAB, R. Recovery analysis for weighted ℓ_1 -minimization using the null space property. *Applied and Computational Harmonic Analysis*, v. 43, n. 1, p. 23-38, 2017.
- MCNAMARA, R K.; CARLSON, S E. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 75, n. 4-5, p. 329-349, 2006.
- MCNAMARA, R K.; VANNEST, J J.; VALENTINE, C J. Role of perinatal long-chain omega-3 fatty acids in cortical circuit maturation: Mechanisms and implications for psychopathology. *World journal of psychiatry*, v. 5, n. 1, p. 15, 2015.
- NOGUEIRA, R A et al. Can a hypercholesterolemic diet change the basal brain electrical activity and during status epilepticus in rats?. *Metabolic brain disease*, v. 34, n. 1, p. 71-77, 2019.

- OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. Estudos avançados, São Paulo, v. 27, n. 77, p. 185-200, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142013000100014&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 16/04/2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142013000100014>.
- PESSOA, D T et al. Effect of diet with omega-3 in basal brain electrical activity and during status epilepticus in rats. **Epilepsy research**, v. 137, p. 33-38, 2017.
- RINCON, A Lopez; S, Shingo. The inverse problem in electroencephalography using the bidomain model of electrical activity. **Journal of neuroscience methods**, v. 274, p. 94-105, 2016.
- VARGHESE, J. P. et al. Frequency characteristics of cortical activity associated with perturbations to upright stability. **Neuroscience letters**, v. 578, p. 33-8, 22 ago. 2014.
- SABLE, P S.; KALE, A A.; JOSHI, S R. Prenatal omega 3 fatty acid supplementation to a micronutrient imbalanced diet protects brain neurotrophins in both the cortex and hippocampus in the adult rat offspring. **Metabolism**, v. 62, n. 11, p. 1607-1622, 2013.
- WEISSTEIN, E. W. Fourier Transform. MathWorld, A Wolfram Web Resource. 2004.
- TANG, M et al. Maternal diet of polyunsaturated fatty acid altered the cell proliferation in the dentate gyrus of hippocampus and influenced glutamatergic and serotonergic systems of neonatal female rats. **Lipids in health and disease**, v. 15, n. 1, p. 71, 2016.
- TEJADA, S et al., Omega-3 Fatty Acids and Epilepsy. In: The Molecular Nutrition of Fats. **Academic Press** p. 261-270, 2019.
- YANG, L. et al. Pathophysiological responses in rat and mouse models of radiation-induced brain injury. **Molecular neurobiology**, v. 54, n. 2, p. 1022-1032, 2017.